

CHI3L1 是一种肝脏富集表达的、无创的肝纤维化诊断和分期标志物

摘要

肝纤维化是一种常见的疾病，可由感染肝炎病毒、毒素和酗酒引发。根据国内外的多种指导原则，肝纤维化的分期和诊断在慢性肝病的治疗中至关重要。肝脏的活组织检查是诊断和分期肝纤维化的金准则，但是容易伤害机体并且受到多种限制。因此，很多研究都注重于发现一种无创的纤维化血清生物标志物。我们的研究发现壳多糖酶 3 样蛋白 1 (CHI3L1) 在肝脏中高度表达。接着比较了不同阶段的肝纤维化病人血清中的 CHI3L1 表达水平，同时做了肝脏的活检，同样发现肝纤维化早期 (S0-S1) 和晚期 (S3-S4) 的 CHI3L1 含量是不同的。研究进一步发现 CHI3L1 是实质性纤维化的一个很好的标志物，实质性纤维化早期 (S2、S3、S4) 和晚期 (S3、S4) 的 ROC 曲线(AUCs)值分别为 0.94 和 0.96。在国内，相较于其他的肝纤维化标志物，如：透明质酸 (HA)、原骨胶原 (PCIII)、层粘连蛋白 (LN) 和 4 型胶原蛋白，CHI3L1 在鉴定 HBV 相关晚期肝纤维化病人上更有优势。

关键字：CHI3L1、肝纤维化、生物标志物

介绍

肝纤维化是肝细胞对诸如病毒感染、毒素、酗酒以及其他慢性损伤的一种修复反应。肝纤维化伴随着由炎症引起的肝实质的破坏和修复的一个持续不断的过程，而且往往会造成严重的并发症，包括门静脉高压症和肝功能衰竭。另外，它也会引发肝细胞癌 (HCC)。肝纤维化可导致肝硬化，其被定义为肝纤维化的晚期阶段(Pellicoro et al., 2014)。乙型肝炎是引起肝纤维化和硬化的主要因素。肝硬化是肝细胞癌发展的一个重要因素(Liao et al., 2013)(Xu et al., 2003)，原因是肝硬化患者累计 5 年患肝细胞癌的风险是 5%到 30%，这将取决于几个因素，包括存在和潜在的肝脏疾病、种族、年龄、性别以及暴露于初级嗜肝病毒的持续时间。因此，在发展成肝硬化前就分期肝纤维化，可让早期肝纤维化被快速检测，从而达到潜在的治疗和监测目的。根据国内外针对包括乙型肝炎在内的慢性肝病的治疗准则，明确表明肝纤维化分期对确定最佳抗病毒时间十分关键 (2000,2002)。丙氨酸转氨酶指数升高到正常值上限或者略高于正常值上限被用来判定开始抗病毒治疗的一个主要指标(Chao et al., 2014)。大约有五分之一的丙氨酸转氨酶指数低于正常值上限的患者患有实质性肝纤维化，这些患者仅根据丙氨酸转氨酶指数来进行最初的治疗，很可能会漏诊(Chao et al., 2014)。因此，增加分期标志物很有必要。

肝脏活检是诊断和分期肝纤维化的金准则(Chao et al., 2014)。然而，肝脏活检是一个很复杂的过程，包含取样和组织染色，还需要由病理学家给出最后的结论。肝脏活检也会带来一些并发症，比如术后疼痛或者出血、取样错误（只有 1/50000 的肝脏是样本），而且病理学家的意见也会不一样(Afdhal, 2004)。在过去的十年中，无论是为了取代肝脏活检还是引导肝脏活检的预筛查，发展了很多无创的技术。这些技术都依赖于以下两种有区别但又互补的方法之一：一种是没有生物标志物的技术，利用弹性成像技术测量肝硬度，例如被广泛推荐的 FibroScan 方法；另一种是血清标记物的方法，这种方法依赖于血清中纤维化标志物的定量化。FibroScan 方法利用瞬时弹性成像技术，可靠的在乙型肝炎和丙型肝炎病人中检查出肝硬化，然而，大约有 20%的乙型肝炎和丙型肝炎不适用，尤其是那些腹积水和肥胖患者，并且随着操作人员的经验不同也会产生多样性(Degos et al., 2010)。对于血清生物标志物，最常见的检测平台是 Fibro 检测（Biopredictive, Houilles, France）和 ActiTest (Biopredictive, Houilles, France)，这些都结合 α -2-巨球蛋白、 α -2-球蛋白（结合珠蛋白）、 γ -球蛋白、载脂蛋白 A1、 γ -谷氨酰转肽酶（GGT）、总胆红素、和年龄以及性别信息来综合判断得出结论。这些检测都被标记为丙肝病毒- FibroSure 检测(LabCorp, Burlington, NC)；这个检测是评价纤维化运用最广泛的。然而，这个检测并不能很好的将肝纤维化分级。Rossi 等人(Rossi et al., 2003)调查了 125 名丙型肝炎患者的 Fibro 检测分数，发现其中有 57 位患者的分数少于 0.1（表明没有纤维化）或者大于 0.6（早期纤维化）。他们发现 13 名分数低于 0.1 的患者其中的 6 名患者（占 18%），看起来没有纤维化，但实际上已经早期纤维化。相反的，有 24 位得分大于 0.6 分的患者理应是早期纤维化的，但其中有 5 位（占 21%）却是已经中期纤维化。研究人员发现大约 19 的患者在测试结果和活体检视上存在巨大差异。Poynard 等人同样发现 Fibro 检测和活体检视之间的差异比例也占到了 28.7%（537 位患者中的 154 位）(Poynard et al., 2012)。因此，找到准确用于纤维化分期的血清标志物很有必要。

CHI3L1（Chitinase 3-like 1，又称 YKL-40）是壳多糖酶家族一员，但其无壳多糖酶活性；它编码的糖蛋白属于 18-糖基水解酶家族一员(Libreros et al.)。此糖蛋白功能目前未知，但是推测 CHI3L1 在炎症和组织重塑中扮演重要角色(Libreros et al.)。免疫组织化学分析表明在肝纤维化区域，特别是在纤维发生活跃的区域 CHI3L1 抗原呈阳性染色。(Johansen et al., 1997) (Johansen et al., 2000)(Tran et al., 2000)(Nojgaard et al., 2003)。然而，据我们所知，CHI3L1 在乙型肝炎相关的肝纤维化方面表现还没有系统性的分析。我们的实验室旨在发现适应于中国人群的肝纤维化的新型生物标志物。因此，我们争取确定 CHI3L1 能否是适用于中国人群乙型肝炎相关慢性肝脏疾病的诊断和分期肝纤维化的良好生物标志物。

材料与方法

病人

此项研究中,自 2012 年 6 月至 2013 年 12 月浙江省人民医院传染病科共收集了 98 例经过皮下穿刺肝活检并未进行持续治疗的慢性乙型肝炎(CHB)患者。研究对象入选标准是年龄大于 20 岁、HBsAg 呈阳性大于 6 个月、HBV DNA 水平 ≥ 103 拷贝/mL 与 ALT 水平 ≤ 2 ULN (ULN=50 U/L); 在样本入选前,ALT 和 HBV DNA 水平监测 6 个月,每月监测一次,以确保病人维持 ALT 水平 ≤ 2 ULN 与 HBV DNA 水平 ≥ 103 拷贝/mL。研究对象排除标准包括人类免疫缺陷病毒(HIV)或丙型肝炎病毒(HCV)共感染、代偿或失代偿性肝硬化、酒精性肝脏疾病、非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD),自身免疫性肝脏疾病以及有其他原因导致的慢性肝脏疾病、肾功能不全、活检样本不足和无完整临床资料。此外,146 例 S3 和 S4 期肝纤维化患者血清样本由其他三家大医院收集,包括浙江大学医学院第一附属医院、浙江大学医学院第二附属医院和邵逸夫医院(中国,杭州)。此研究征得每位病人知情同意,研究程序符合 1975 年赫尔辛基宣言伦理指南,并得到每个医院机构审查委员会批准。

酶联免疫吸附法(ELISA)

CHI3L1 ELISA 试剂盒(杭州普望生物技术有限公司,中国浙江杭州)定量检测血清 CHI3L1 水平。

肝活检和肝纤维化分期

肝活检确定肝纤维化分期。使用超声引导 18G 活检针经皮下穿刺进行肝活检。然后,标本固定,石蜡包埋,苏木精和伊红染色(HE)。纤维化的诊断,1.5-2.5 cm 的肝脏组织至少包含六个肝门束用于分析。肝纤维化分期(S0-S4)判定采用 Scheuer 分类系统,此系统由一个失明病理学家整理病人的临床资料得到。

统计分析

统计分析采用 MedCalc 软件(13.0.0.0 版本)。组间差异使用 Mann-Whitney U-test 检验(用于连续变量和独立样本非参数分析)。比较 ROC 分析使用先前 Delong 等人描述的非参数法(DeLong et al., 1988)。

结果

CHI3L1 是一个高表达肝基因,其表达高度富集于肝脏

在正常生理条件下, CHI3L1 在许多组织中低表达或不表达(Johansen, 2006)。例如, CHI3L1 在正常人单核细胞中不表达, 但在人巨噬细胞分化后期被高诱导表达 (Krause et al., 1996)。然而, 高通量技术到来之前并未在多种组织中对 CHI3L1 表达进行系统的分析。2008 年, Dezsó 等 (Dezsó et al., 2008) 对 32 个人的组织进行微阵列分析, 并且除这 32 个组织以外其他组织也均被检测 (数据未发表), 发现 CHI3L1 在肝中表达水平最高。但是, 由于微阵列的动态范围有限, 实际上最初我们并没有重视 CHI3L1 在肝组织中高表达。RNA 测序 (RNA-Seq) 相较于较老的技术, 其能够在一个大得多的动态范围检测基因表达水平, 如 cDNA 芯片可以在大的动态范围内检测许多正常人体组织 CHI3L1 表达水平。从 Illumina Human Body Map 2.0 (<http://genomicdbdemo.bxgenomics.com/>) 获得的数据显示, 在肝脏中 CHI3L1 表达水平为 552 FPKM (每一百万个片段映射到外显子的每 1kb 个片段数), 而在其他 15 个组织的数据显示其表达水平非常低 (中位数 15, 肾脏中最大值为 36), 包括所有的主要器官, 如心脏、脑、乳腺、结肠、肾脏、肺、肌肉、淋巴结、甲状腺和白细胞 (图 1)。CHI3L1 在肝脏中的表达水平比其他组织高出 15.3 (与肾脏比) 到 276 倍 (与心脏比)。这些数据表明, CHI3L1 是肝特异性或高度肝富集基因, 并且它也大量表达。在 552 FPKM, CHI3L1 的表达水平甚至比 PSA (KLK3) 更高, 在 Illumina Human Body Map 2.0 数据库中, 在 349 FPKM 时 PSA 是前列腺特异性基因和前列腺癌的标志物。CHI3L1 作为高表达基因建立, 其表达富集在肝脏中非常重要, 因为这是对 CHI3L1 表达水平相似于许多组织误解的更正, 因此应减少其可能不是作为肝脏疾病的良好标志物的疑虑(Johansen, 2006)。

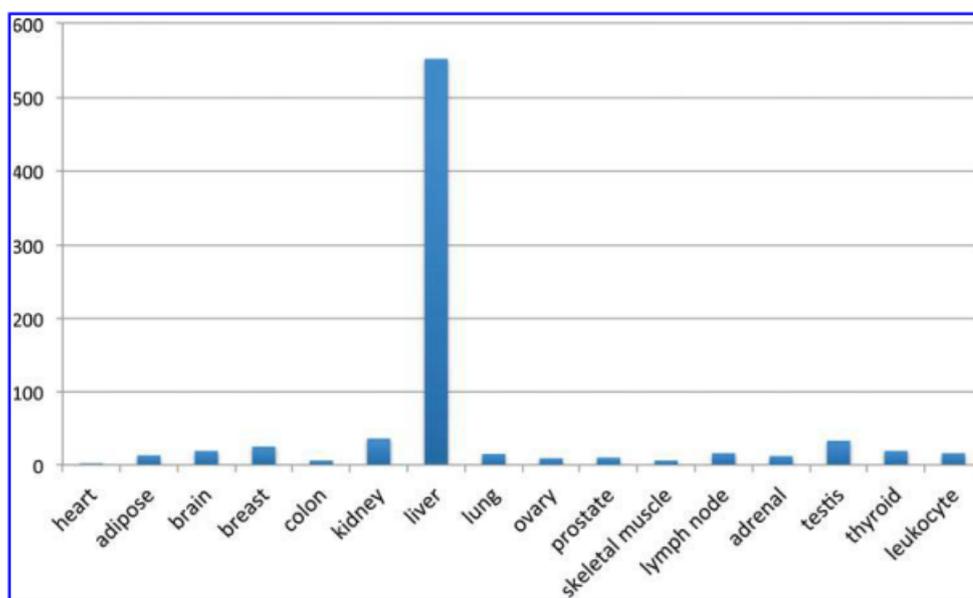


图 1 测定 16 个正常人类组织中 CHI3L1 的表达水平

数据来自 Illumina Human Body Map 2.0 (<http://genomicdbdemo.bxgenomics.com/>)。Y 轴: FPKM 数值 (每一百万个片段映射到外显子的每 1kb 个片段数); 每个柱形代表一个不同的组织。

CHI3L1 能够区分肝纤维化的早期阶段（S0-S2）和晚期阶段（S3-S4）

为了研究 CHI3L1 是否能够区分肝纤维化的早期阶段和晚期阶段，我们分别比较了 39 例 S0 期、36 例 S1 期、16 例 S2 期和 153 例 S3 或 S4 期的肝纤维化病人中血清 CHI3L1 蛋白的表达水平。不同肝纤维化阶段的活检组织染色代表图片如图 2 所示。分析中用到的所有原始数据见附表 1（附表资料可在以下网址浏览 <http://www.liebertpub.com/omi>）。我们计算出肝纤维化不同阶段的病人血清中 CHI3L1 表达的平均值（见表 1）。

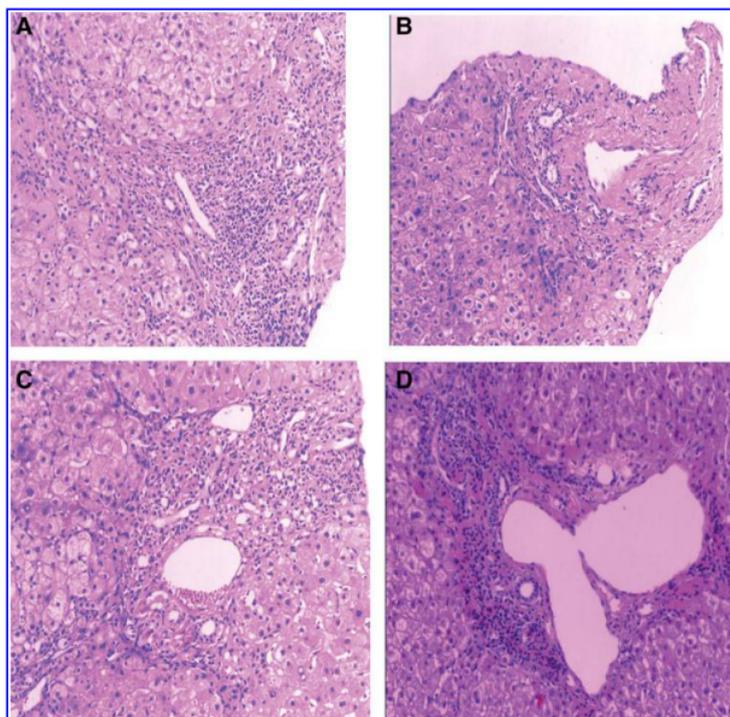
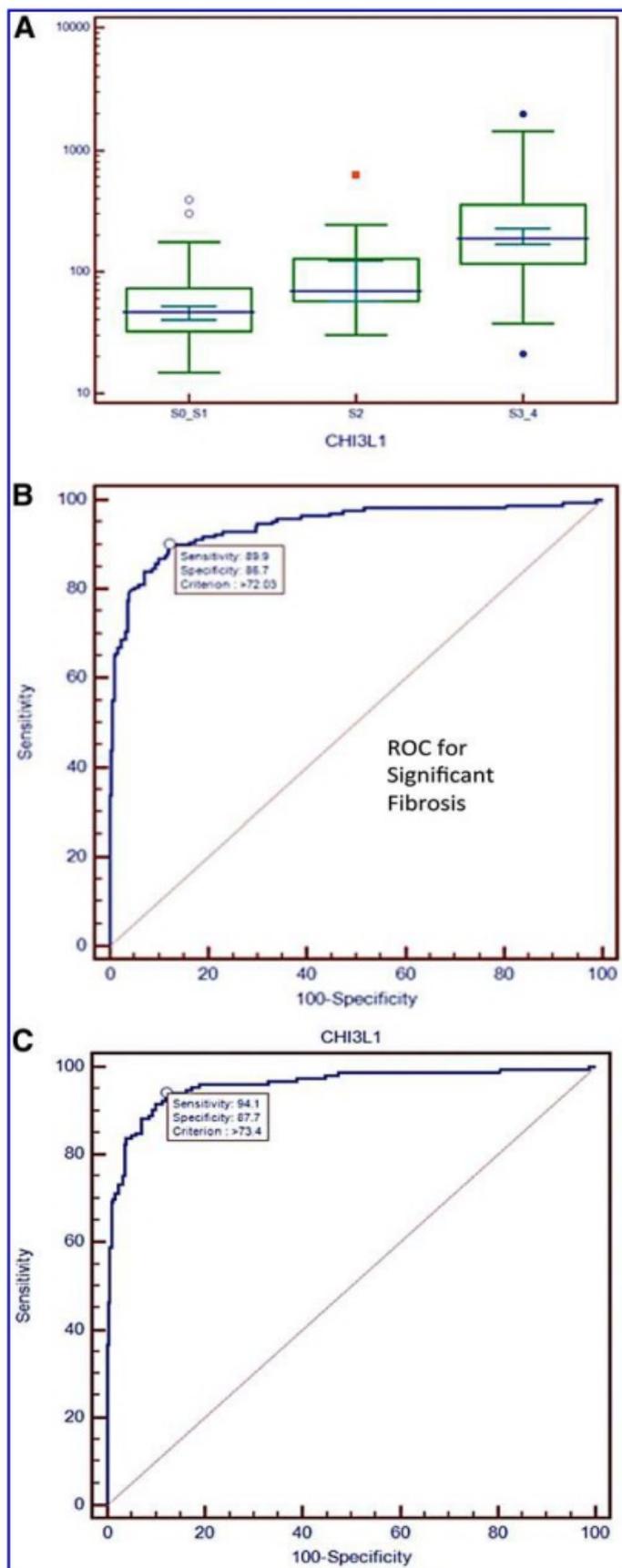


图 2 不同肝纤维化阶段的活检组织病理染色图

A-D 分别是不同肝纤维化阶段 S0、S1、S2 和 S4 的代表图片

附表 1 肝纤维化不同阶段病人血清中 CHI3L1 表达的平均值

| Stage | N | Median | 95% CI |
|-------|-----|---------|-----------------|
| S0 | 39 | 46.150 | 38.692–55.790 |
| S1 | 36 | 47.050 | 35.963–55.396 |
| S2 | 16 | 69.475 | 57.165–125.007 |
| S3–S4 | 153 | 188.800 | 169.408–228.196 |



我们发现在无肝纤维化病人（S0）和最早肝纤维化时期（S1）病人的 CHI3L1 蛋白水平并无差异。所以将两者组合为早期肝纤维化（S0-S1）。在 S0-S1 病人组合中，CHI3L1 蛋白表达水平的中值为 46.51 ng/ml，平均值为 64.79 ng/ml。在肝纤维化 S2 时期的病人中，CHI3L1 蛋白表达水平的中值为 69.48 ng/ml，平均值为 130.04 ng/ml。在肝纤维化 S3-S4 期的病人中，CHI3L1 蛋白表达水平的中值增加到 188.88 ng/ml，平均值增加到 277.46 ng/ml。对三组不同肝纤维化阶段的病人所做的盒形图显示在图 3A 中，从肝纤维化 S0-S1 病人组和肝纤维化 S2 期病人组中，我们发现 CHI3L1 蛋白水平有显著的统计学差异（ $P=0.0015$ ，曼-惠特尼 U 检验，双侧）。同时发现肝纤维化 S2 期病人和肝纤维化 S3-S4 病人的 CHI3L1 蛋白水平也有显著的统计学差异（ $P=0.0002$ ，曼-惠特尼 U 检验，双侧）。因此，研究发现血清 CHI3L1 蛋白水平能够区分与 HBV 相关的中国肝纤维化病人的不同肝纤维化阶段：早期（S0-S1）、中期（S2）、晚期（S3-S4）。

CHI3L1 是一种实质性或晚期的肝纤维化诊断标志物

当选用 CHI3L1 水平大于 73.4 ng/ml 的标准诊断晚期纤维化时，实质性和晚期肝纤维化的 CHI3L1 水平差异敏感度为 94.1%，特异度为 87.7%。接着我们招募来自杭州邵逸夫医院的病人作为预测血清 CHI3L1 表达水平的验证集合。

图 3 分析 CHI3L1 作为肝纤维化分期和诊断的标志物

我们共招募 168 个正常人和 85 个晚期 (S3, S4) 肝纤维化病人 (附表 2)。当以 78.48 ng/ml 为临界值时, 验证集合晚期肝纤维化的 ROC 曲线下面积为 0.96, 敏感度和特异度分别为 91.8% 和 91.7%。原来以 73.4 ng/ml 为临界值时, 验证集合的敏感度为 91.76%, 特异度为 87.06%。

CHI3L1 和其他常用的晚期肝纤维化血清标志物的比较

透明质酸 (HA)、原骨胶原 (PCIII)、层粘连蛋白 (LN) 和四型胶原常 (CIV) 被作为肝纤维化或者肝硬化的血清标志物。我们比较了 CHI3L1 和其他血清标志物在检测晚期肝纤维化中的表现。我们一个一个检测了 36 个晚期肝纤维化患者和 50 个正常人血清中的 CHI3L1 和其他 4 个旧的标志物 HA、PCIII、LN 和 CIV 的水平。所有的数据展示在附表 3 中。我们对这 5 个诊断晚期纤维化标志物做了 ROC 分析 (图 4A)。CHI3L1 的 AUC 值为 0.99, 是 5 个标志物中最好的 (图 4B)。

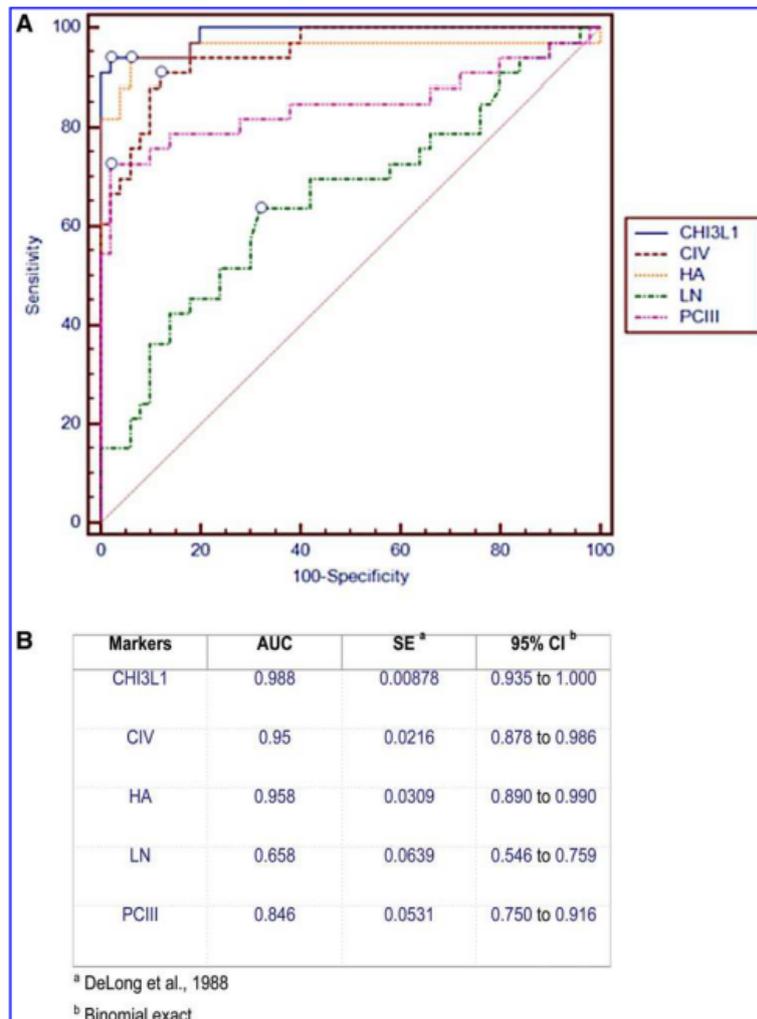


图 4 比较分析 CHI3L1 和其他四个肝纤维化的血清标志物

讨论

对肝纤维化进行正确的分期对慢性肝炎的治疗是十分关键的。肝纤维化分期的金标准就是肝脏穿刺活检，这不仅是一个损伤性的过程，而且本身也有很多局限。首先，在肝组织活检中，检测的样本只约占肝脏体积的 1/50000，所以穿刺活检并不能够反映整个肝脏纤维化的变化，因此 10%-30%的肝硬化病人不能够检测出来。其次，穿刺的劣势包括病理分析和并发症风险的不一致，这些并发症包括中等的腹痛，严重的出血以及胆道系统的损伤。因此，许多研究者正在寻找一种无损伤的过程或者检测方法来对肝纤维化进行分期或者能够真正诊断肝纤维化。

在这个研究中，CHI3L1 是一种能够区分 HBV 相关的早期肝纤维化和晚期肝纤维化的标志物。这个检测方法对与指导 HBV 携带者的治疗起着关键的作用。Adams 追寻一种算法，它能够正确可靠的在丙型肝炎病人中预测肝纤维化的分期，这种算法是基于几个血清标志物和基于胆红素，谷氨酰转移酶水平，透明质酸水平以及巨球蛋白水平，年龄，性别的模型。这个模型对实体肝纤维化（S2，S3，S4），晚期肝纤维化（S3，S4）和肝硬化产生的 ROC 曲线的线下面积（AUC）值分别为 0.85,0.96 和 0.94。

进一步研究表明 CHI3L1 能够鉴定大量的肝纤维化（ \geq S2）或者晚期肝纤维化（ $>$ S3）。我们的结果表明 CHI3L1 对中国 HBV 相关的晚期肝纤维化的鉴定优于其他的肝纤维化血清标志物透明质酸，三型骨原胶原，层粘连蛋白和四型胶原。我们观察到中国患者中 HBV 相关的肝纤维化与早先报道的 HCV 相关的肝纤维化很相似。Rath 等，最近比较了多种检测 HCV 相关肝纤维化的标志物优劣，包括了 CHI3L1，透明质酸，层粘连蛋白，C 端一型元骨胶原肽断，MMP-9，TIMP-1，TIMP-2 和 MMP-9-TIMP-1 的复合物。结果发现 CHI3L1 在所有的标志物中表现最好。

结论

我们研究表明 CHI3L1 是一个肝富集的基因，也许会帮助我们对中国 HBV 病人肝纤维化进行分期以及对晚期肝纤维化的诊断。